

09/743612

PCT/JP00/03002

日本国特許庁

11.05.00

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/03002

REC'D 03 JUL 2000

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 5月13日

EKY

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第132432号

出願人
Applicant(s):

松下電器産業株式会社

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

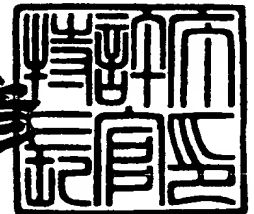
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月16日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特2000-3045048

【書類名】 特許願

【整理番号】 2892010031

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明者】

【住所又は居所】 香川県高松市古新町 8 番地の 1 松下寿電子工業株式会
社内

【氏名】 高橋 三枝

【発明者】

【住所又は居所】 香川県高松市古新町 8 番地の 1 松下寿電子工業株式会
社内

【氏名】 灘岡 正剛

【発明者】

【住所又は居所】 香川県高松市古新町 8 番地の 1 松下寿電子工業株式会
社内

【氏名】 田中 宏橋

【特許出願人】

【識別番号】 000005821

【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100084364

【弁理士】

【氏名又は名称】 岡本 宜喜

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044336

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

特平 1 1 - 1 3 2 4 3 2

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9004841

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 クロマト定量測定装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 シート状の支持体に対して湿潤可能な部材を積層し、前記支持体の面と平行な方向に複数の湿潤層を形成し、前記複数の湿潤層を夫々試料添加層、標準試薬保持層、反応層、吸収層とするクロマトグラフィー試験片上を用い、前記反応層での呈色反応結果を分析することにより、前記試料添加層に添加された液体試料中の分析対象物の濃度を測定するクロマト定量測定装置において、

前記液体試料中の分析対象物と特異的に結合可能な捕捉試薬が固定化される反応領域が前記反応層に設けられた反応領域と、

前記反応領域における呈色反応の度合いを光学的に定量測定する呈色度合測定手段と、を具備することを特徴とするクロマト定量測定装置。

【請求項 2】 前記反応領域は、

前記反応層上にスポット形態で複数箇所に形成されていることを特徴とする請求項 1 記載のクロマト定量測定装置。

【請求項 3】 前記反応領域は、

前記反応層上の全面に渡って形成されていることを特徴とする請求項 1 記載のクロマト定量測定装置。

【請求項 4】 前記反応層上に固定化された捕捉試薬の濃度が、全ての反応領域において一定であることを特徴とする請求項 1 記載のクロマト定量測定装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗原抗体反応を利用して、被検物質を定量測定するクロマト定量測定装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

従来、被検物質である液体試料の化学試験又は臨床試験を行う装置として、抗原抗体反応を用いた免疫クロマトグラフィーによる測定が広く用いられている。そして従来の免疫クロマトグラフィー試験片を用いた定量測定は、半定量の測定方法であり、その一例を図4に示す。図4において液体試料が移動可能な層であり、液体試料を添加する試料添加層3と、標識試薬が保持され、液体試料の浸透により標識試薬が移動可能な標識試薬保持層4と、流れてきた分析対象物と特異的に化学結合するための捕捉試薬が固定化された反応層2と、流れてきた試料を吸水する吸水層5とからなる試験片を含んで構成されている。そして反応層2には、捕捉試薬固定化部を線状に一定数本配列させた反応領域6Cを設けた構造となっている。

【0003】

このような免疫クロマトグラフィー試験片を反応層担体と呼ぶ。このような反応層担体に液体試料を添加して一定時間放置し、その後に現れる呈色反応を調べることにより、被検物質の有無を判定することができる。即ち、液体試料を試料添加層3に添加すると、液体試料が浸透して標識試薬保持層4に達する。すると、標識試薬が液体試料の浸透により溶解されながら、反応層2に浸透していく。この過程で液体試料中の分析対象物と標識試薬とが結合する。この結合物が反応層2で特異的に反応して、捕捉試薬固定化部である線状の反応領域6Cで呈色反応を引き起こす。

【0004】

液体試料中に分析対象物が少ない場合は、標識試薬結合物の量も少なく、呈色部分は、複数本ある反応領域6Cの上流部分に限定され、呈色本数が少なくなる。一方、分析対象物が多い場合は、標識試薬結合物の量も多くなり、呈色部分は、複数本ある反応領域6Cの下流部分まで広がることになる。

【0005】

従来は、この原理を利用して反応領域6Cの呈色本数を調べることにより、液体試料中に分析対象物の濃度を、「多い」～「少ない」の3段階、5段階、10段階のいずれかで半定量的に評価していた。

【0006】

例えば、上記のような方法で免疫クロマトグラフィーの分析結果を定量化する手段としては、特開平5-5743号に開示されるものがある。ここでは、クロマトグラフィー試験片上に、クロマト上流から下流に向けて順に濃度が増加するよう、独立して固定化された捕捉試薬が反応領域に複数箇所散布されている。そしてこの部分で発色した反応領域の数を計数することにより、半定量化測定を行う。

【0007】

また特開平6-341989号に開示されるものがある。ここでは、所定量で固定化されて存在する分析対象物に対する抗体により、固定化された抗体量に対応する試料中の分析対象物の一定量を捕捉して分析物を減少させることにより、簡易的に半定量化する方法などがある。

【0008】

また、特開平8-240591号に開示されるものがある。ここでは免疫クロマトグラフィー試験片に試料を添加して反応を行った後に、所定の検出区域における呈色度合を調べる。即ち呈色部分の吸収や反射等の信号を、検出用計器を用いて測定し、その結果を定量化するようにしている。

【0009】

免疫クロマトグラフィー測定原理は、抗原抗体反応の特異性を利用し、様々な分析対象物の検定に活かすことが可能である。しかし、分析対象物によっては、定量的な測定結果が要求される場合に、半定量的な結果しか出せないという限界が生じる。このため、免疫クロマトグラフィー試験片を用いて、分析結果のより正確な定量化測定を行うための装置の実現が望まれてきた。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

免疫クロマトグラフィー試験片を用いて定量測定を行う場合、その呈色度合の強弱や濃淡を基に、分析対象物の濃度を測定する方法が考えられる。従来の免疫クロマトグラフィー試験片を用いると、クロマトグラフィーの展開は、機械的なコントロールが無い状態で行われ、人為的に反応速度を制御することができな

った。このため分析対象物の浸透速度は試験片自身の浸透性に左右され、測定毎時、試験片毎、同一試験片上の部位毎に夫々展開される試料量や標識試薬の量が不均一となり、試験片上の呈色度合に大幅なばらつきが生じる。また、反応領域を特定箇所限定して、その部位の呈色度合を計測する場合、標識試薬の浸透性が影響して測定誤差が大きくなるため、分析対象物を定量化するのは困難であった。これらの原因から、免疫クロマトグラフィーによる定量測定の性能は、限りなく半定量に近いものとなっていた。

【0011】

本発明は、このような従来の問題点に鑑みてなされたものであって、免疫クロマトグラフィーにおける定量化性能を向上できるクロマト定量測定装置を実現することを目的とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本願の請求項1の発明は、シート状の支持体に対して湿潤可能な部材を積層し、前記支持体の面と平行な方向に複数の湿潤層を形成し、前記複数の湿潤層を夫々試料添加層、標準試薬保持層、反応層、吸収層とするクロマトグラフィー試験片上を用い、前記反応層での呈色反応結果を分析することにより、前記試料添加層に添加された液体試料中の分析対象物の濃度を測定するクロマト定量測定装置において、前記液体試料中の分析対象物と特異的に結合可能な捕捉試薬が固定化される反応領域が前記反応層に設けられた反応領域と、前記反応領域における呈色反応の度合いを光学的に定量測定する呈色度合測定手段と、を具備することを特徴とするものである。

【0013】

請求項1の構成によれば、クロマトグラフィー試験片上の反応層において、分析対象物と結合可能な捕捉試薬が固定化された反応領域上の複数箇所を計測することにより、液体試料の浸透状況を制御することなく、試験片上の呈色反応を正確に測定することができ、定量性能を向上させる作用を有する。

【0014】

本願の請求項2の発明は、請求項1のクロマト定量測定装置において、前記反

応領域は、前記反応層上にスポット形態で複数箇所に形成されていることを特徴とするものである。

【0015】

請求項2に記載の構成によれば、捕捉試薬が固定化された反応領域の形状が点及び球状のスポットからなり、1つ以上の複数個が反応層上に不規則に存在することにより、液体試料の浸透状況に左右されることなく反応が行われる作用を有する。

【0016】

本願の請求項3の発明は、請求項1のクロマト定量測定装置において、前記反応領域は、前記反応層上の全面に渡って形成されていることを特徴とするものである。

【0017】

請求項3に記載の構成によれば、捕捉試薬が固定化された反応領域の形状が面状からなり、反応層上に広範囲に存在することにより、液体試料の浸透状況に左右されることなく反応が行われる作用を有する。

【0018】

本願の請求項4の発明は、請求項1のクロマト定量測定装置において、前記反応層上に固定化された捕捉試薬の濃度が、全ての反応領域において一定であることを特徴とするものである。

【0019】

請求項4に記載の構成によれば、反応領域に固定化された捕捉試薬が、全て一定濃度であることにより、呈色反応の均一化を図る作用を有する。

【0020】

【発明の実施の形態】

本発明のクロマト定量測定装置について説明する。このクロマト定量測定装置は、免疫クロマトグラフィー試験片の構造を改良することにより、分析対象物との反応結果である呈色度合を定量的に読み取り可能にする。免疫クロマトグラフィー定量測定において、液体試料の流量と浸透性を制御することなく、より高感度及び高性能な定量精度を持つ免疫クロマトグラフィー試験片を提供するため、

本発明ではクロマトグラフィー材料からなる反応層担体上の表面に、多数の反応領域を有することを特徴とする免疫クロマトグラフィー試験片を作製した。

【0021】

このような免疫クロマトグラフィー試験片を用いて、複数の部位の呈色度合を計測したり、分析対象物の濃度を算出することにより、クロマトグラフィー試験片上の試料の流量と浸透性に左右されることのない、高感度かつ高性能なクロマトグラフィー定量分析装置を構成する。

【0022】

本発明の免疫クロマトグラフィー試験片の反応領域には、分析対象物と特異的に結合可能な捕捉試薬が固定化し、この捕捉試薬の濃度を全ての反応領域において一定にする。このような構造の免疫クロマトグラフィー試験片を用いれば、特定箇所に反応領域や計測部位が限定されないため、反応層担体上の任意の部位において呈色反応を見ることができる。そのため、液体試料の浸透と共に展開される標識試薬の溶出状況を反映した呈色反応が、結果として反応層担体上全体に現れる。これらの呈色度合を呈色度合測定手段を用いて計測又は演算処理することで、より高感度及び高性能なクロマト定量測定が実現される。

【0023】

また本発明において反応層担体として、ニトロセルロースやガラス繊維濾紙のような任意の多孔質性担体で構成されたクロマトグラフィー材料からなる試験片を用いる。この試験片は例えば、抗原抗体反応のような測定原理を用いることにより、特定物質を分析検出したり、定量化する機能を持たせることができる。液体試料としては例えば、水や水溶液、尿、血液、体液、固体及び粉体や気体を溶かした溶液を試料とすることができる。試験項目としては、例えば尿検査、妊娠検査、水質検査、便検査、土壌分析、食品分析等が考えられる。これにより、任意の被検査溶液に存在する分析対象物を、簡単かつ確実に定量測定することが可能となる。

【0024】

(実施の形態)

上記のような機能を有する免疫クロマトグラフィー試験片の実施の形態につい

て、図 1 ～図 3 を参照しつつ説明する。図 1 は免疫測定を行う免疫クロマトグラフィー試験片の構造を示す斜視図である。ここで免疫クロマトグラフィー試験片を反応層担体と総称する。図 1 に示すように、反応層担体は支持体 1、反応層 2、試料添加層 3、標識試薬保持層 4、吸水層 5 を含んで構成される。

【 0 0 2 5 】

支持体 1 はクロマトグラフィー材料を支持するもので、プラスチック等で構成される。試料添加層 3 は支持体 1 の上に不織布等が設けられた領域であり、被検物質をふくむ液体試料を添加又は塗布するための領域である。標識試薬保持層 4 は、不織布等が設けられ、不織布に溶解可能なように標識試薬が保持された領域である。反応層 2 はニトロセルロース等からなり、抗体と抗原が反応する領域である。吸水層 5 は液体試料を最終的に吸水する領域である。

【 0 0 2 6 】

このような構造の反応層担体では、被検物質を含む液体試料が試料添加層 3 に接触すると、液体試料は試料添加層 3 全体に浸透する。液体試料が標識試薬保持層 4 の領域に達すると、この領域に保持された標識試薬が液体試料の浸透により溶解される。そして溶解物質は反応層 2 の領域に浸透していく。反応層 2 の領域上には、分析対象物（被検物質）と特異的に結合する捕捉試薬が固定化された部分がある。このため、標識試薬保持層 4 の領域から溶けだした標識試薬との結合反応が行われる。液体試料は最終的に吸水層 5 に吸い取られて反応は終了する。

【 0 0 2 7 】

液体試料中に分析対象物が存在すれば、反応層 2 の領域に何らかの呈色反応が見られる。この呈色反応を呈色度合測定手段を用いて計測又は演算処理することで、定量測定する。

【 0 0 2 8 】

尚、支持体 1 の構成素材をプラスチックとし、反応層 2、試料添加層 3、標識試薬保持層 4、吸水層 5 の構成素材を不織布やニトロセルロースとしたが、それらはいずれも一例であり、前述した素材に限定されたものではない。例えば支持体 1 を任意の液体不透過性材料で構成し、反応層 2、試料添加層 3、標識試薬保持層 4、吸水層 5 を任意の多孔質性担体で構成してもよい。

【 0 0 2 9 】

次に、反応層 2 の反応領域の形態について図 2 及び図 3 を用いて説明する。図 2 及び図 3 は、反応層担体上の反応領域の異なる例を示す平面図であり、図 1 と同一部分は同一の符号を付け、それらの部分の説明を省略する。図 2 に示す例では、反応層 2 A として、捕捉試薬を複数の点又はスポット状に固定化させた反応領域 6 A を設ける。図 3 に示す例では、反応層 2 B として、反応層全面に捕捉試薬を固定させた反応領域 6 B を設ける。こうすると、反応層担体上を流れる分析対象物を、浸透状況に関わらず確実に捕獲することができ、試験片毎の呈色度合のばらつきを回避することができる。

【 0 0 3 0 】

以上のような構造の免疫クロマトグラフィー試験片を用い、反応層 2 上の呈色度合を計測するべく、ランダムな複数部位ドットをサンプリングする。この場合に用いる呈色度合測定手段として、呈色の吸収や反射の信号を読み取る機器、又は CCD カメラを用いた画像解析機器とが利用できる。例えば、測定値を基に呈色度合の平均値を算出する。サンプリング数を多くすれば、半定量の域を越えた正確な定量測定ができる。こうして高感度及び高性能な定量測定が可能なクロマト定量測定装置を実現することができる。

【 0 0 3 1 】

【発明の効果】

以上のように本発明によれば、液体試料の浸透と標識試薬の展開を制御する必要がなくなり、より高感度及び高性能なクロマト定量測定が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の実施の形態のクロマト定量測定装置において、免疫クロマトグラフィー試験片の構造を示す斜視図である。

【図 2】

本実施の形態において、反応層の反応領域のパターン（その 1）を示す免疫クロマトグラフィー試験片の平面図である。

【図 3】

本実施の形態において、反応層の反応領域のパターン（その 2）を示す免疫クロマトグラフィー試験片の平面図である。

【図 4】

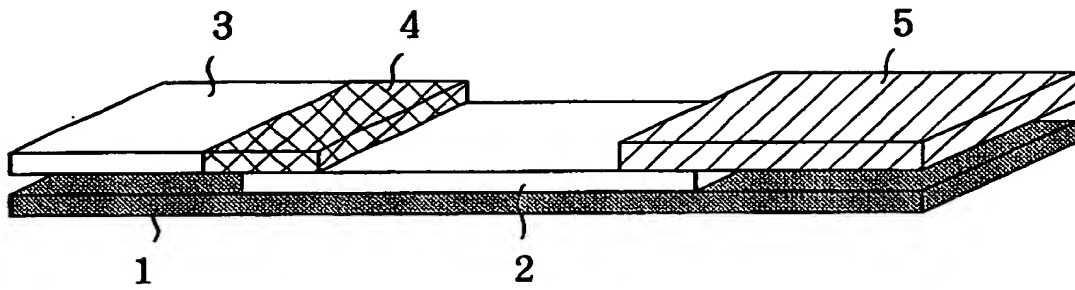
従来の免疫クロマトグラフィー試験片の構造を示す平面図である。

【符号の説明】

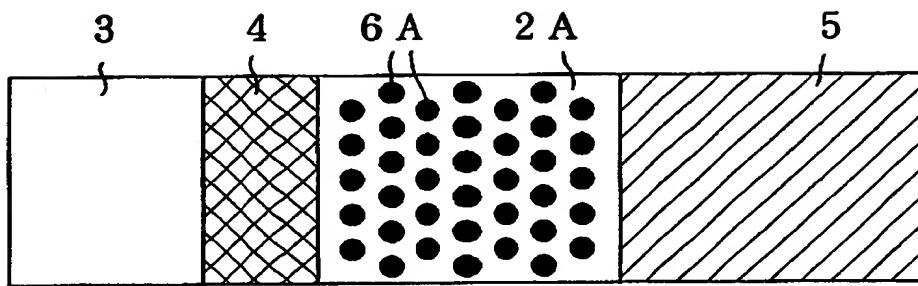
- 1 支持体
- 2, 2 A, 2 B 反応層
- 3 試料添加層
- 4 標識試薬保持層
- 5 吸水層
- 6 A, 6 B 捕捉試薬の反応領域

【書類名】 図面

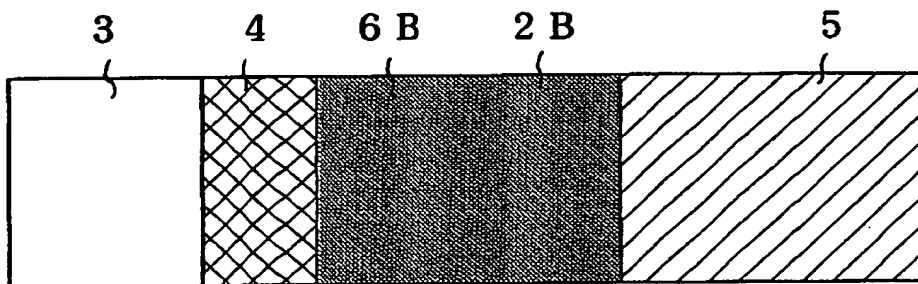
【図 1】



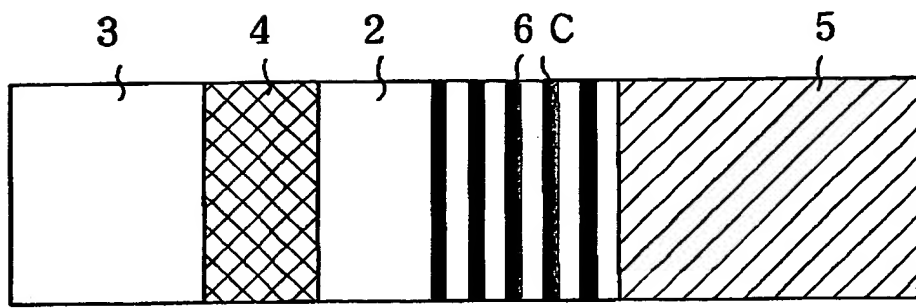
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 免疫クロマトグラフィーの反応層担体表面上の反応領域において、複数箇所の反応状況を計測及び演算処理することにより、液体試料中の分析対象物の定量検出の測定性能を向上させること。

【解決手段】 反応層 2、試料添加層 3、標識試薬保持層 4、吸水層 5 を支持体 1 に保持させ、クロマトグラフィー試験片を製作する。反応層 2 において、分析対象物と特異的に結合する捕捉試薬を固定した反応領域 6 A を複数箇所に設け、その領域の反応状況を計測する。こうすると、液体試料の浸透を制御することなく、より高感度に分析対象物を定量分析できる。

【選択図】 図 2

認定・付加情報

特許出願の番号	平成 1 1 年 特許願 第 1 3 2 4 3 2 号
受付番号	5 9 9 0 0 4 5 0 0 3 3
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0 0 9 0
作成日	平成 1 1 年 5 月 1 7 日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成11年 5月13日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 5 8 2 1]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 2 8 日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地

氏 名 松下電器産業株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)